

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 31/565, 31/575</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 95/13076</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 18. Mai 1995 (18.05.95)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE94/01309 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 8. November 1994 (08.11.94) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 43 38 314.9      10. November 1993 (10.11.93)    DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> JE-NAPHARM GMBH [DE/DE]; Patentabteilung, Otto-Schott-Strasse 15, D-07745 Jena (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> DROESCHER, Peter [DE/DE]; Trierer Strasse 18, D-99423 Weimar (DE). MENZENBACH, Bernd [DE/DE]; Otto-Schwarz-Strasse 4, D-07745 Jena (DE). PONSOLD, Kurt [DE/DE]; Thomas-Mann-Strasse 13 a, D-07743 Jena (DE). UNDEUTSCH, Bernd [DE/DE]; Spitzweidenweg 11, D-07743 Jena (DE). OETTEL, Michael [DE/DE]; Beethovenstrasse 30, D-07743 Jena (DE). RÖMER, Wolfgang [DE/DE]; Otto-Schwarz-Strasse 68 A, D-07745 Jena (DE). KAUFMANN, Günter [DE/DE]; Schillbachstrasse 41, D-07743 Jena (DE). SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Theobald-Renner-Strasse 15, D-07747 Jena (DE).		<b>(74) Anwalt:</b> CRAMER, Eva-Maria; Jenapharm GmbH, Patentabteilung, Otto-Schott-Strasse 15, D-07745 Jena (DE). <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BG, BR, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, LK, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.          Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> USE OF STEROIDS WITH A PHENOLIC A-RING STRUCTURE FOR PROPHYLAXIS AND THERAPY OF RADICAL-MEDIATED CELL DAMAGE <b>(54) Bezeichnung:</b> VERWENDUNG VON STEROIDEN MIT PHENOLISCHER A-RING-STRUKTUR ZUR PROPHYLAXE UND THERAPIE RADIKALVERMITTELTETER ZELLSCHÄDIGUNGEN <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention pertains to new pharmaceutical preparations for prophylaxis and therapy of radical-mediated cell damage, consisting of steroids with phenolic A-ring structure-except the estrogens estradiol, estrone, estrione and their 2-hydroxy derivatives as well as the steroids with cyclic substituents or with an amino group at the terminal C atom of the aliphatic C-17 side chain-and of pharmaceutical adjuvants. These preparations are characterized by a high-level inhibiting action against cell and tissue changes, such as lipid peroxidation and the oxidation of low density lipoprotein (LPL) cholesterol, caused by reactive oxygen species (ROS), free oxygen radicals and other forms of radical; these preparations thus prevent irreversible membrane and endothelial damage resulting therefrom. They therefore contribute to improving the prophylaxis and therapy of radical-induced damage such as that caused by oxygen radicals and/or ROS.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft neue pharmazeutische Präparate zur Prophylaxe und Therapie radikalvermittelter Zellschädigungen, bestehend aus Steroiden mit phenolischer A-Ring-Struktur, ausgenommen die Estrogene Estradiol, Estron, Estrion und deren 2-Hydroxy-Derivate sowie die Steroide mit cyclischen Substituenten oder mit einer Aminogruppe am terminalen C-Atom der aliphatischen C-17-Seitenkette, und pharmazeutischen Hilfsstoffen. Diese Präparate zeichnen sich durch eine hohe Hemmwirkung auf die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), freie Sauerstoffradikale und weitere Radikalformen ausgelösten Zell- und Gewebeveränderungen aus, wie beispielsweise die Lipidperoxidation und die Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterol, und vermindern damit die dadurch bedingten irreversiblen Membran- und Endothelschädigungen. Sie tragen deshalb zu einer Verbesserung der Prophylaxe und Therapie radikalbedingter wie u.a. Sauerstoffradikal-bedingter und/oder durch ROS ausgelösten Schädigungen bei.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

<b>AT</b>	Österreich	<b>GA</b>	Gabon	<b>MR</b>	Mauretanien
<b>AU</b>	Australien	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MW</b>	Malawi
<b>BB</b>	Barbados	<b>GE</b>	Georgien	<b>NE</b>	Niger
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>NL</b>	Niederlande
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>NO</b>	Norwegen
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>NZ</b>	Neuseeland
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>PL</b>	Polen
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IT</b>	Italien	<b>PT</b>	Portugal
<b>BY</b>	Belarus	<b>JP</b>	Japan	<b>RO</b>	Rumänien
<b>CA</b>	Kanada	<b>KE</b>	Kenya	<b>RU</b>	Russische Föderation
<b>CF</b>	Zentrale Afrikanische Republik	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>SD</b>	Sudan
<b>CG</b>	Kongo	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik Korea	<b>SE</b>	Schweden
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>SI</b>	Slowenien
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>SK</b>	Slowakei
<b>CM</b>	Kamerun	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SN</b>	Senegal
<b>CN</b>	China	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>TD</b>	Tschad
<b>CS</b>	Tschechoslowakei	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>TG</b>	Togo
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LV</b>	Lettland	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>DE</b>	Deutschland	<b>MC</b>	Monaco	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>DK</b>	Dänemark	<b>MD</b>	Republik Moldau	<b>UA</b>	Ukraine
<b>ES</b>	Spanien	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>FI</b>	Finnland	<b>ML</b>	Mali	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>FR</b>	Frankreich	<b>MN</b>	Mongolei	<b>VN</b>	Vietnam

VERWENDUNG VON STEROIDEN MIT PHENOLISCHER A-RING-STRUKTUR ZUR  
PROPHYLAXE UND THERAPIE RADIKALVERMITTELTEN ZELLSCHÄDIGUNGEN

**Pharmazeutische Präparate zur Prophylaxe und Therapie  
radikalvermittelter Zellschädigungen**

5

Die Erfindung betrifft neue pharmazeutische Präparate zur Prophylaxe und Therapie radikalvermittelter Zellschädigungen.

10 Aus der Fach- und Patentliteratur ist bekannt, daß reaktive Sauerstoffspezies (ROS), freie Sauerstoffradikale und weitere Radikalformen eine wichtige Rolle bei der Entstehung vielfältiger Zellschädigungen spielen, beispielsweise bei ischämischen und traumatischen Organver-

15 Auch bei Hirn- und Wirbelsäulenverletzungen, Schockzuständen, Schlaganfall, Muskeldystrophie, Emphysemen, ARDS, Asthma, Alterungsprozessen, bei Gewebeschädigungen nach Myokardinfarkt, Vergiftungs- und Verstrahlungsschäden, Verbrennungen und transplan-

20 tationsbedingten Immunreaktionen ist ein negativer Einfluß von ROS, freien Sauerstoffradikalen und anderen Radikalformen zu verzeichnen. Dabei ist u.a. die Lipidperoxidation und die Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterol in Verbindung mit irreversiblen Membran- und Endothelschädigungen Ausgangspunkt für solche radikalvermittel-

25 Es ist weiterhin bekannt, daß lipophile Substanzen, wie z.B. lipophile Steroide mit "radikalfangenden" Eigenschaften sich zur Prophylaxe und Therapie radikalvermittelter Zellschädigungen eignen können.

30 Im Unterschied zu den bekannten niedermolekularen phenolischen Antioxidantien werden diese lipophilen Steroide mit gewisser Selektivität in die Region der Zellmembran bzw. des Endothels transportiert und können dort ihre Wirksamkeit entfalten

Der therapeutische Nutzen wird dabei vom Wirkungsspektrum der jeweiligen Substanz bestimmt.

35 WO-PS 87/01706; WO-PS 91/11453; EP-PS 0389 368; EP-PS 0389 369; EP-PS 0389 370 und FR-PS 2 640 977 beschreiben beispielsweise Steroide mit "radikalfangenden" Eigenschaften.

WO-PS 87/01706; WO-PS 91/11453; EP-PS 0389 368/...369/...370 beschreiben Steroide, die am terminalen Kohlenstoff-Atom der C-17-Seitenkette eine Aminogruppe enthalten, die substituiert bzw. Bestandteil eines heterocyclischen Ringsystems sein kann.

- 5 In FR-PS 2 640 977 wird ein Strukturtyp aufgezeigt, der am C-11-Atom in  $\beta$ -Position einen substituierten Phenylring aufweist.

10 In J. Phys. Org. Chem. 3 (1990), 309-315 wird dargestellt, daß Estrogene, speziell Catecholestrogene, als Radikalfänger agieren können. Estradiol, Estron, Estriol und 2-Hydroxy-estradiol hemmen die Peroxidation in vitro und in vivo.

15 Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue pharmazeutische Präparate mit hoher Wirksamkeit zur Prophylaxe und Therapie radikal-vermittelter Zellschädigungen zu finden.

20 Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß pharmazeutische Präparate gefunden wurden, bestehend aus Steroiden mit phenolischer A-Ring-Struktur, ausgenommen die in ihrer diesbezüglichen Wirkung bekannten Estrogene  $17\beta$ -Estradiol, Estron, Estriol und deren 2-Hydroxy-Derivate sowie Steroide mit cyclischen Substituenten oder mit einer Aminogruppe am terminalen C-Atom der aliphatischen C-17-Seitenkette, und pharmazeutischen Hilfsstoffen.

25 Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind dabei die im Anspruch 2 aufgeführten Verbindungen.

30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate zur oralen und parenteralen, incl. topischen, rektalen, subcutanen, intravenösen, intramuskulären, intraperitonealen, intranasalen, intravaginalen, intrabukkalen oder sublingualen Applikation, die neben üblichen Träger- und Verdünnungsmitteln eine im Anspruch 1 oder 2 aufgezeigte Verbindung als Wirkstoff enthalten.

35

Die Arzneimittel der Erfindung werden mit den üblichen festen oder flüssigen Trägerstoffen oder Verdünnungsmitteln und den üblicherweise verwendeten pharmazeutisch-technischen Hilfsstoffen entsprechend der gewünschten Applikationsart mit einer geeigneten Dosierung in bekannter Weise hergestellt.

Die Vorteile der Erfindung ergeben sich im wesentlichen dadurch, daß neue pharmazeutische Präparate zur Prophylaxe und Therapie radikal-vermittelter Zellschädigungen gefunden wurden,

10

- mit Wirkstoffen, deren Wirkprofil sich von dem der bekannten weiter oben erwähnten Estrogene sowie von dem des Vitamin E unterscheidet und/oder
- 15 - mit Wirkstoffen, die eine hohe Wirksamkeit bezüglich der Hemmung der Lipidperoxidation und LDL-Oxidation in vitro besitzen, im Vergleich zu den erwähnten Estrogenen, zum U-78517F und zum Vitamin E.

20 Die vorteilhafte Wirkung der erfindungsgemäßen Systeme als Inhibitoren der Lipidperoxidation und LDL-Oxidation werden in Tabelle 1 und Tabelle 2 demonstriert.

Als Vergleiche zu den erfindungsgemäßen Systemen dienten 17 $\beta$ -Estradiol, Estriol, U-78517F und Vitamin E, ebenfalls in Tabelle 1 und 25 Tabelle 2 dargestellt und mit (x) gekennzeichnet.

Die Messung der In-vitro-Hemmwirkung auf die Lipidperoxidation wurde mittels des Thiobarbitursäuretestes vorgenommen.

30

Mit der Aussage zu den IC<sub>50</sub>-Hemmwerten wird die lipidperoxidationshemmende Wirkung der jeweiligen Verbindung charakterisiert. IC<sub>50</sub> gibt die Menge der zuzugebenden Substanz an, um eine 50%ige Hemmung der Lipidperoxidation zu erzielen (Tabelle 1).

Die Messung der In-vitro Hemmwirkung auf die LDL-Oxidation wurde nach ESTERBAUER et al. (1988): Effect of peroxidative conditions on human plasma low density lipoproteins. In: Eicosanoids, lipid peroxidation and cancer (Hrsg. Nigam et al.), S. 203-214, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, vorgenommen.

Die in Tabelle 2 aufgeführten Werte für eine Hemmung der LDL-Oxidation stellen Beispiele für Herz-Kreislauf-Aktivitäten dar.

Aussagen zur Estrogenität werden über die Messung der Estrogen-Rezeptor-Bindung getroffen.

Die Messung der Estrogen-Rezeptor-Bindung erfolgt durch kompetitive Bindung des  $^3\text{H}$ -markierten synthetischen Estrogens Ethinylestradiol und der zu testenden Verbindungen am Estrogen-Rezeptor im Uterus-Cytosol des infantilen Kaninchens bei 0 °C. Dabei werden Reaktionsgleichgewicht und Rezeptorsättigung angestrebt.

Aus Konzentrationsreihen, die die jeweilige  $\text{IC}_{50}$  einschließen, werden die  $\text{IC}_{50}$  für die Standardsubstanz  $17\beta$ -Estradiol und für die zu testende Verbindung ermittelt (Regressionsrechnung nach logit-log-Transformation) und als Quotient dieser beiden Werte die relative Bindungsaffinität (RBA) angegeben.

Mit der Aussage zu den RBA-Werten wird die Estrogen-Rezeptor-Affinität der jeweiligen Verbindung charakterisiert, die unter Berücksichtigung bestimmter Voraussetzungen für In-vitro-Untersuchungen (z.B. freie 3-OH-Gruppe) ein Maß für die Estrogenität ist (ebenfalls Tabelle 1).

Tabelle 1

Lipidperoxidationshemmung und Estrogen-Rezeptor-Affinität ausgewählter Verbindungen

Verbindung		Lipidperoxida- tionshemmung [ IC <sub>50</sub> : µmol ]	relative Bindungsaffinität z. Estrogen-Rezeptor [ % ]
17β-Estradiol	(x)	12,4	100
ent-Estradiol		8,8	6,7
17-Epi-estradiol		8,9	22,8
8-Dehydro-estradiol		1,0	59,6
8-Dehydro-17-epiestradiol		4,1	
8(14)-Dehydroestradiol			
6,8-Didehydro-17-epiestradiol		5,1	
Estriol	(x)	122,5	10,3
6-Dehydro-estriol		45,6	7,9
9(11)-Dehydroestriol		10,6	7,5
20-Hydroxymethyl-3-hydroxy-1,3,5(10)- pregnatrien		14,4	22,5
Vitamin E	(x)	132,0	
U-78517F	(x)	1,8	
14α,15α-Methylen-8-dehydro-estradiol		0,9	
14α,15α-Methylen-estradiol		5 - 10	
14β,15β-Methylen-8-dehydro-estradiol		1,9	
2-Hydroxy-estradiol-3-methylether		3,2	
3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17S- spirooxiran		4,11	
3-Hydroxy-1,3,5(10),9(11)-estratetraen- 17S-spirooxiran		0,81	

Tabelle 2  
LDL-Oxidations-Hemmwirkungen  
ausgewählter Verbindungen (5  $\mu$ mol)

Verbindung		LDL-Oxidationshemmwirkung (Verlängerung der lag-Phase in min)
17 $\beta$ -Estradiol	(x)	110
ent-Estradiol		120
8-Dehydro-estradiol		120
Estriol	(x)	45
U-78517F	(x)	70
3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17S- spirooxiran		170
3-Hydroxy-1,3,5(10),9(11)-estratetraen- 17S-spirooxiran		210



Es ist aus Tabelle 1 ersichtlich, daß die Radikalscavenger-Eigenschaften unabhängig sind von der Estrogenität der jeweiligen Verbindungen. Beispielsweise ist die In-vitro-Hemmwirkung auf die Lipidperoxidation für ent-Estradiol genauso hoch wie für 17-Epi-estradiol, jedoch die  
5 Estrogenität signifikant unterschiedlich.

Weiterhin ist Tabelle 1 und Tabelle 2 zu entnehmen, daß die erfindungsgemäß ermittelten Verbindungen sowohl eine Lipidperoxidationshemmende als auch eine LDL-Oxidationshemmende Wirkung in vitro  
10 besitzen, die höher ist als die des Vitamin E bzw. in der Größenordnung oder besser, als die des 17 $\beta$ -Estradiols, Estriols und U-78517F liegt.

Weiterhin wurde gefunden, daß konjugierte Doppelbindungen, wie die  
15 6-,8- und 9(11)-Doppelbindung ebenso wie die 8(14)-Doppelbindung, zur erheblichen Steigerung der Lipidperoxidations- und der LDL-Oxidations-Hemmung führen.

Die erfindungsgemäßen Präparate stellen sowohl Inhibitoren der Lipidperoxidation als auch Inhibitoren der LDL-Oxidation dar und sind deshalb geeignet zur Prophylaxe und Therapie radikalvermittelter Zellschädigungen wie beispielsweise beim spinalen Trauma, des ischämischen (thromboembolischen) Schlaganfalls, der Ischämie, des Organschadens in der Reperfusionphase nach Transplantationen, den chronisch-degenerativen Erkrankungen des ZNS, der Senilen Demenz vom  
25 Alzheimer-Typ (SDAT), des Asthma, der muskulären Dystrophie und degenerativer neurologischer Krankheiten u.a. in Form von ZNS-Intoxikations- bzw. Degenerationszuständen.

Die erfindungsgemäßen Präparate erweisen sich ebenfalls als vorteilhaft zur Prophylaxe und Therapie solcher durch radikalvermittelte Zellschädigungen hervorgerufenen Erkrankungen, wie die multiple Sklerose, die Skin Graft Reaction, Akute Pankreatitis, Lebernekrosen (z.B. virale Hepatitis), der hämorrhagische, traumatische und septische  
35 Schock, Entzündungszustände, wie die osteo- oder rheumatoide Arthritis, adjuvante Arthritis, Arthrose, das nephrotische Syndrom

(immunologisch), das systemische Lupus erythematosus, die Adriamycin-induzierte Herztoxizität und neuroprotectiven Hirntumoren.

- Die erfindungsgemäßen Präparate eignen sich auch zur Prophylaxe und Therapie derartiger durch radikalvermittelte Zellschädigungen hervorgerufenen Erkrankungen, wie allergische Reaktionen, die Atherosklerose, die Entzündung unter dermatologischen, inflammatorischen und psoriatischen Bedingungen, der Stress-induzierte Ulcer, Migräne, die maligne Hyperthermie, das hypoxische Syndrom, das ischämische Bowel-Syndrom und die Reduzierung der notwendigen Dosis bei der therapeutischen Anwendung radikalabbauender Enzyme, wie z.B. Superoxiddismutase und Catalase.

- Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Arzneimittel als antitumorale Wirksubstanzen einsetzbar und eignen sich für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von Herz- und Kreislauf-Krankheitszuständen.

## Untersuchungen zur pharmakologischen Wirksamkeit der "radikal-fangenden" Substanzen

- 5 Die Testung der Substanzen auf die Hemmwirkung bezüglich der Lipid-peroxidation wurde mittels des Thiobarbitursäuretestes folgendermaßen durchgeführt:
- 10 **Reaktionsansatz**  
1 ml biologische Probe (cont. 0,1 mg Plasmamembranen) incl. Fenton's Reagenz und Testsubstanz.  
Die 1 ml Gesamtvolumen teilen sich auf in 0,01 bis 0,02 ml synaptosomale Membranfraktion; 0,1 ml Eisen(II)-chlorid (2 mmol); 0,1 ml Wasserstoffperoxid (2mmol), auf 1 ml auffüllen mit 0,9 % NaCl (nicht PBS)
- 15 und Ethanol oder DMSO als Vehikel der Testsubstanz.

### Prozedere

- 20 Der Reaktionsansatz wird 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 2 ml Reagenz A abgestoppt und 10 min bei konstanten 80 °C inkubiert. Nach Abkühlen in einem Eisbad (10 min) wird die Probe in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (1000 x g; 4 °C). Der Überstand wird (bis zu 2 h stabil) bei 535 nm gegen den Blindwert gemessen, der bis auf die
- 25 Membranfraktion alle Reagenzien enthält.  
Als Vergleichswert dient der Ansatz, der neben der Membranfraktion NaCl sowie im gegebenen Falle Vehikel mit gleichen Anteilen erhält.
- 30 **Zusammensetzung des Reagenz A**  
15 % (w/v) Trichloressigsäure (15 g); 0,375 % (w/v) Thiobarbitursäure (375 mg) ; 0,25 n HCl (2,11 ml konz. HCl)  
in 100 ml wäßriger Lösung.

**Prüfsubstanzen**

Die Prüfsubstanzen werden vorzugsweise in Ethanol als 20 millimolare Stammlösungen angesetzt und entsprechend verdünnt. Geprüft wird im Dosierungsbereich 1 - 150  $\mu\text{mol}$ .

- 5 In allen Versuchsansätzen wird eine entsprechende Standardsubstanz mitgeführt.

**Bewertungsparameter**

- 10 – Dosis-Wirkungsanalyse der Prüfsubstanzen.  
– Ermittlung der Lipidperoxidationshemmwerte mit mindestens fünf Substanzkonzentrationen im Hemmbereich 30 bis 70 %, bezogen auf die Testwerte ohne Substanzeffekt.

15

Die Testung der Substanzen auf die Hemmwirkung bezüglich der LDL-Oxidation nach der Methode von Esterbauer et al. (1988) wurde folgendermaßen ausgeführt:

20 **Reaktionsansatz**

2 ml biologische Probe (cont. 0,5 mg LDL, isoliert aus humanem Vollblut, incl. 10  $\mu\text{mol}$   $\text{CuSO}_4$  sowie 1 bis 150  $\mu\text{mol}$  Testsubstanz und Ethanol als Vehikel der Testsubstanz im zellfreien Medium PBS.

25

**Prozedere**

- Der Reaktionsansatz wird bei RT über einen Zeitraum von mindestens 8 h inkubiert und spektralphotometrisch (Absorptionsmaximum des oxidierten LDL liegt bei 234 nm) verfolgt. Entsprechend den bei der Meßwellenlänge von 234 nm registrierten Extinktionsveränderungen in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Testsubstanzen bzw. in der Gegenüberstellung des nativen zum oxidierten LDL werden definitive Aussagen zur Beeinflussung des oxidierten LDL durch Testsubstanzwirkung ermöglicht.
- 30

35

**Prüfsubstanz n**

Die Prüfsubstanzen werden vorzugsweise in Ethanol als 20 millimolare Stammlösungen angesetzt und entsprechend verdünnt. Geprüft wird im Dosierungsbereich 1 - 150  $\mu\text{mol}$ .

- 5 In allen Versuchsansätzen wird eine entsprechende Standardsubstanz mitgeführt.

**Bewertungsparameter**

- 10
  - Dosis-Wirkungsanalyse der Prüfsubstanzen.
  - Ermittlung der LDL-Oxidations-Hemmwerte, ausgewiesen als Verzögerung der LDL-Oxidation in Form einer zeitlich verlängerten lag-Periode (min).

**Pat ntansprüche**

1. Pharmazeutische Präparate zur Prophylaxe und Therapie  
radikalvermittelter Zellschädigungen,  
5 bestehend aus Steroiden mit phenolischer A-Ring-Struktur,  
ausgenommen
  - die Estrogene Estradiol, Estron, Estriol und deren  
2-Hydroxy-Derivate,
  - Steroide mit cyclischen Substituenten oder mit einer  
10 Aminogruppe am terminalen C-Atom der aliphatischen  
C-17-Seitenkette,  
und pharmazeutischen Hilfsstoffen
2. Pharmazeutische Präparate nach Anspruch 1  
15 mit zusätzlicher konjugierter Doppelbindung  
oder 8(14)-Doppelbindung

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nal Application No

T/DE 94/01309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K31/565 A61K31/575

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	EP,A,0 535 595 (INSTITUTE OF APPLIED BIOCHEMISTRY) 7 April 1993 see the whole document ---	1
---	--	---

X	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US AN 80:91450 see abstract & IZV.AKAD.NAUK. SSSR, SER. BIOL., vol.5, 1973 pages 664 - 670 SOROKINA, I.B. ET AL 'ESTROGEN AND ANTINEOPLASTIC ACTIVITY IN A SERIES OF TRANSFORMED ESTRONE AND ESTRADIOL ANALOGS' --- -/--	1
---	---	---

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 1995

Date of mailing of the international search report

07.03.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Mair, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/01309


## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CHEMABS            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,            OHIO, US            AN 100:74040            see abstract            &amp; ARH. FARM.,            vol.33, no.4, 1983            pages 159 - 165            AGBABA, D. ET AL 'DETERMINATION OF            CONJUGATED ESTROGENS IN PHARMACEUTICALS'            ---</p>	1
P,X	<p>DE,A,42 39 946 (JENAPHARM GMBH) 1 June            1994            see the whole document            ---</p>	1
X	<p>FR,A,2 429 797 (VEB JENAPHARM) 25 January            1980            see the whole document            ---</p>	1
X	<p>US,A,3 436 411 (AMERICAN HOME PRODUCTS            CORPORATION) 1 April 1969            see the whole document            besonders Spalte 1, Zeile 38            ---</p>	1
X	<p>GB,A,1 196 643 (AMERICAN HOME PRODUCTS) 1            July 1970            see the whole document            ---</p>	1
X	<p>STEROIDS,            vol.14, no.3, 1969            pages 335 - 341            EDGREN, R.A. ET AL 'AN ANTI-ESTRADIOL            EFFECT OF ENT-ESTRADIOL-17 BETA'            besonders Seite 340, Tabelle 1            see the whole document            ---</p>	1
X	<p>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY,            vol.33, 1990            pages 1145 - 1151            JACOBSEN, E.J. ET AL 'NOVEL            21-AMINOSTEROIDS THAT INHIBIT            IRON-DEPENDENT LIPID PEROXIDATION AND            PROTECT AGAINST CENTRAL NERVOUS SYSTEM            TRAUMA'            see the whole document            ---</p>	1
X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,            vol.262, no.22, 1987            pages 10438 - 10440            BRAUGHLER, J.M. ET AL 'NOVEL 21-AMINO            STEROIDS AS POTENT INHIBITORS OF            IRON-DEPENDENT LIPID PEROXIDATION'            see the whole document            ---</p>	1

-/--



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

	Int. Application No. <b>PCT/DE 94/01309</b>
--	--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 322 020 (AKZO N.V.) 28 June 1989 see claim 1 <div style="text-align: center;">---</div>	1
X	DATABASE WPI Week 9039, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-292274 & EP,A,0 389 370 (ROUSSEL-UCLAF) 26 September 1990 cited in the application see abstract <div style="text-align: center;">-----</div>	1

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DE 94/01309

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-0535595	07-04-93	JP-A-	5294991	09-11-93
		JP-A-	5294987	09-11-93
		JP-A-	5170786	09-07-93
		JP-A-	5170790	09-07-93
		JP-A-	5170787	09-07-93
		JP-A-	5202092	10-08-93
		CA-A-	2078804	02-04-93
-----				
DE-A-4239946	01-06-94	NONE		
-----				
FR-A-2429797	25-01-80	BE-A-	877197	15-10-79
		DE-A-	2911612	10-01-80
		GB-A, B	2027030	13-02-80
		JP-A-	55009071	22-01-80
		NL-A-	7905020	03-01-80
		SE-A-	7905658	29-12-79
		SU-A-	1087525	23-04-84
		US-A-	4231946	04-11-80
-----				
US-A-3436411	01-04-69	NONE		
-----				
GB-A-1196643	01-07-70	BE-A-	700232	01-12-67
		CH-A-	581148	29-10-76
		CH-A-	565200	15-08-75
		CH-A-	561229	30-04-75
		DE-A, C	1793677	02-03-72
		DE-A, B, C	1618070	02-03-72
		FR-M-	6922	05-05-69
		FR-A-	1528394	
		FR-A-	1528934	
		GB-A-	1196642	01-07-70
		NL-A-	6708563	22-12-67
		SE-B-	362422	10-12-73
-----				
EP-A-0322020	28-06-89	AU-A-	2690888	22-06-89
		JP-A-	1211527	24-08-89
-----				

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ales Aktenzeichen

T/DE 94/01309

KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A61K31/565 A61K31/575

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 535 595 (INSTITUTE OF APPLIED BIOCHEMISTRY) 7. April 1993 siehe das ganze Dokument ---	1
X	DATABASE CHEMABS CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US AN 80:91450 siehe Zusammenfassung & IZV.AKAD.NAUK. SSSR, SER. BIOL., Bd.5, 1973 Seiten 664 - 670 SOROKINA, I.B. ET AL 'ESTROGEN AND ANTINEOPLASTIC ACTIVITY IN A SERIES OF TRANSFORMED ESTRONE AND ESTRADIOL ANALOGS' --- -/--	1

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Februar 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

0 7. 03. 95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mair, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE CHEMABS            CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,            OHIO, US            AN 100:74040            siehe Zusammenfassung            &amp; ARH. FARM.,            Bd.33, Nr.4, 1983            Seiten 159 - 165            AGBABA, D. ET AL 'DETERMINATION OF            CONJUGATED ESTROGENS IN PHARMACEUTICALS'            ---</p>	1
P,X	<p>DE,A,42 39 946 (JENAPHARM GMBH) 1. Juni            1994            siehe das ganze Dokument            ---</p>	1
X	<p>FR,A,2 429 797 (VEB JENAPHARM) 25. Januar            1980            siehe das ganze Dokument            ---</p>	1
X	<p>US,A,3 436 411 (AMERICAN HOME PRODUCTS            CORPORATION) 1. April 1969            siehe das ganze Dokument            besonders Spalte 1, Zeile 38            ---</p>	1
X	<p>GB,A,1 196 643 (AMERICAN HOME PRODUCTS) 1.            Juli 1970            siehe das ganze Dokument            ---</p>	1
X	<p>STEROIDS,            Bd.14, Nr.3, 1969            Seiten 335 - 341            EDGREN, R.A. ET AL 'AN ANTI-ESTRADIOL            EFFECT OF ENT-ESTRADIOL-17 BETA'            besonders Seite 340, Tabelle 1            siehe das ganze Dokument            ---</p>	1
X	<p>JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY,            Bd.33, 1990            Seiten 1145 - 1151            JACOBSEN, E.J. ET AL 'NOVEL            21-AMINOSTEROIDS THAT INHIBIT            IRON-DEPENDENT LIPID PEROXIDATION AND            PROTECT AGAINST CENTRAL NERVOUS SYSTEM            TRAUMA'            siehe das ganze Dokument            ---</p>	1
X	<p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,            Bd.262, Nr.22, 1987            Seiten 10438 - 10440            BRAUGHLER, J.M. ET AL 'NOVEL 21-AMINO            STEROIDS AS POTENT INHIBITORS OF            IRON-DEPENDENT LIPID PEROXIDATION'            siehe das ganze Dokument            ---</p>	1
	<p>---            -/--</p>	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ales Aktenzeichen

CT/DE 94/01309

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 322 020 (AKZO N.V.) 28. Juni 1989 siehe Anspruch 1 ---	1
X	DATABASE WPI Week 9039, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-292274 & EP,A,0 389 370 (ROUSSEL-UCLAF) 26. September 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung -----	1

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 94/01309

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0535595	07-04-93	JP-A- 5294991	09-11-93
		JP-A- 5294987	09-11-93
		JP-A- 5170786	09-07-93
		JP-A- 5170790	09-07-93
		JP-A- 5170787	09-07-93
		JP-A- 5202092	10-08-93
		CA-A- 2078804	02-04-93
DE-A-4239946	01-06-94	KEINE	
FR-A-2429797	25-01-80	BE-A- 877197	15-10-79
		DE-A- 2911612	10-01-80
		GB-A, B 2027030	13-02-80
		JP-A- 55009071	22-01-80
		NL-A- 7905020	03-01-80
		SE-A- 7905658	29-12-79
		SU-A- 1087525	23-04-84
		US-A- 4231946	04-11-80
US-A-3436411	01-04-69	KEINE	
GB-A-1196643	01-07-70	BE-A- 700232	01-12-67
		CH-A- 581148	29-10-76
		CH-A- 565200	15-08-75
		CH-A- 561229	30-04-75
		DE-A, C 1793677	02-03-72
		DE-A, B, C 1618070	02-03-72
		FR-M- 6922	05-05-69
		FR-A- 1528394	
		FR-A- 1528934	
		GB-A- 1196642	01-07-70
		NL-A- 6708563	22-12-67
		SE-B- 362422	10-12-73
EP-A-0322020	28-06-89	AU-A- 2690888	22-06-89
		JP-A- 1211527	24-08-89